

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-199883

(43)公開日 平成5年(1993)8月10日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12N 15/54	ZNA			
1/19		9050-4B		
1/21		7236-4B		
9/10		7823-4B		
		8931-4B		
		C12N 15/00		A

審査請求 未請求 請求項の数17(全23頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-287860	(71)出願人	000216162 天野製菓株式会社 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号
(22)出願日	平成3年(1991)10月16日	(71)出願人	000000068 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(31)優先権主張番号	特願平2-282566	(72)発明者	高木 博史 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内
(32)優先日	平2(1990)10月19日	(72)発明者	荒深 志乃 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外3名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リコンビナントトランスグルタミナーゼ

(57)【要約】

【構成】 トランスグルタミナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを提供する。さらに、上記DNAを組み込んだ発現分泌ベクター、該発現分泌ベクターにより形質転換された形質転換体、及び該形質転換体を培養することを特徴とするトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質の製造方法を提供する。

【効果】 遺伝子工学的手法により、トランスグルタミナーゼの効率的な大量生産が可能になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA：

【表1】

10	20	30	40
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333			
50	60	70	80
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333			
90	100	110	120
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333			
130	140	150	160
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333			
170	180	190	200
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333			
210	220	230	240
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333			
250	260	270	280
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333			
290	300	310	320
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333			
330			
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333			

【請求項2】 下記に示す塩基配列を有する請求項1記載のDNA：

【表2】

化学合成 mature

GAT TCT GAT GAC AGA GTC ACT CCA CCA GCT
GAA CCA TTG GAT AGA ATG CCA GAT CCA TAC
AGA CCA TCT TAC GGT AGA GCT GAA ACT GTT
GTC AAC AAC TAC ATT AGA AAG TGG CAA CAA
GTC TAC TCT CAC AGA GAT GGT AGA AAG CAA
CAA ATG ACT GAA GAA CAA AGA GAA TGG TTG
TCT TAC GGT TGT GTT GGT GTT ACT TGG GTT
AAC TCT GGT CAA TAC CCA ACT AAC AGA TTG
GCT TTC GCT TCT TTC GAT GAA GAT AGA TTC
AAG AAC GAA TTG AAG AAC GGT AGA CCA AGA
TCC GGT GAA ACT AGA GCT GAA TTC GAA GGT

【請求項5】 下記に示す塩基配列を有する請求項3記載のDNA：

※40

Cloning 遺伝子

ATCGCTATA CCGCGAGGC TCTGCTTC CCACTATGA GTGCGTTTA TGCACCGCG
GATTCATGC GTGCGCGGC GAGCGCGCG CCGACAATG CCGCGCGGAA GAGACGAAGT
CCTACCGCGA AACCTACCGC CTCACCGCG ATGACGTCG GACATCAACG CGCTCAACGA
AGCGCTCCGG CCGCTTCGAG CCGCGCGCG TCGTTCGGG CCGCGGACTC CGACGACAG
GTCACCGCTC CCGCGGAGC GCTCGACAG ATGCGCGACC CGTACCGTCC CTCGTACCGC
AGCGCGGAGA CGGTGTCGA CAACTACATA GCGAAGTGC AGCAGTCTA CAGCCACCGC
GACCGGAGGA AGCAGCAGAT GACCGAGGAG CAACCGGAGT GGTGTCTTA CGGTGCGTC
GGTGTCACT GGTCAATTG GGTGAGTAC CCGACGAGA GACTGCGCTT CGGTGCTTC
GACGAGGAGA GGTTCAGAA CGAGCTGAAG AACCGGAGC CCGGTGCGG CGAGACCGCG
CGCGAGTTC AGCGCGCGT CCGGAAGGAG AGCTTGTATG AAGAGAAAGG GTTCCAGCG

* AGA GTT GCT AAG GAA TCT TTC GAT GAA GAA
AAG CGT TTC CAA AGA GCT AGA GAA GTT GCT
TCT GTT ATG AAC AGA GCT CTA GAA AAC GCT
CAC GAT GAA TCT GCT TAC TTG GAT AAC TTG
AAG AAG GAA TTG GCC AAC GGT AAC GAT GCT
TTG AGA AAC GAA GAT GCT AGA TCC CCA TTC
TAC TCT GCT TTG AGA AAC ACT CCA TCT TTC
AAG GAA AGA AAC GGT GGT AAC CAC GAT CCA
TCC AGA ATG AAG GCT GTT ATT TAC TCT AAG
CAC TTC TGG TCT GGT CAA GAT AGA TCT TCT
TCT GCT GAT AAG AGA AAG TAC GGT GAT CCA
GAT GCT TTC AGA CCA GCT CCA GGT ACC GGT
TTG GTC GAC ATG TCC AGA GAT AGA AAC ATT
CCA AGA TCC CCA ACT TCT CCA GGT GAA GGT
TTC GTC AAC TTC GAT TAC GGT TGG TTC GGT
GCT CAA ACT GAA GCT GAT GCT GAT AAG ACT
GTT TGG ACC CAT GGT AAC CAC TAC CAC GCT
CCA AAC GGT TCT TTG GGT GCT ATG CAC GTC
TAC GAA TCT AAG TTC AGA AAC TGG TCT GAA
GGT TAC TCT GAT TTC GAT AGA GGT GCT TAC
GTT ATT ACT TTC ATT CCA AAG TCT TGG AAC
ACT GCT CCA GAC AAG GTC AAG CAA GGT TGG
CCA

【請求項3】 下記に示すアミノ酸配列の全部又は一部を更に5'末端にコードする塩基配列を含む請求項1記載のDNA：

【表3】

	-75	-70	-60	-50
30	-40	-30	-20	-10
	5555 55555555 55555555 55555555			
	55555555 55555555 55555555 55555555			

【請求項4】 下記に示す塩基配列を更に5'末端を含む請求項3記載のDNA：

【表4】

化学合成 Pre Pro

AAGAGAAGATCTCCAACTCCAAAGCCAACTCTTCTAGAGAAGATGACTTCTAGACACCAA
AGAGCTCAAGATCTGCTCCAGCTGCTTCTTCTGCTGCTCCATCTTTCAGAGCTCCA
T T A P

*

CCGGTGACG TGGCTCGGT GATGAACAGG CCCCTCGAGA ACCCCACGA CGAGAGCCCT
TACCTCGACA ACCTCAAGAA GGAAGTGGCG AACGCCAAG ACCCCCTCGG CAACGAGGAC
GCCCCGTTCC CGTTCTACTC GCGCTCGCG AACACCCCGT CCTTTAAGGA CCGGAACCGA

GGCAATCAGG ACCCGTCCAG GATGAAGGCC GTCATCTACT CGAAGCACTT CTGGAGCCGC
CAGGACCCGT CGAGTTCCGC CGACAAGAGG AAGTACCGCG ACCCCGACGC TTTCCGCCCC
GCCCCCGGGA CCGGCTCGT CGACATGTCG AGGACAGGA ACATTCCCGG CAGCCCCACC
AGCCCCGGTG ACGGATTCGT CAATTTGAC TACCGCTGGT TCGGCGCCCA GACGGAAGCG
GACCCCGACA AGACCGTCTG GACCCACGGA AATCACTATC ACCGCCCAA TGGCAGCCTT
GGTCCCATGC ATGTATACGA GAGCAAGTTC CGCAACTGGT CCGAAGTTA CTCGACTTC
GACCCCGGAG CCTATGTGAT CACCTTCATC CCGAAGAGCT GGAACACCGC CCGGACAAG
GTAAAGCAGG GCTGCGCG

【請求項6】 化学合成により得られることを特徴とする、請求項1～4のいずれか一項記載のDNA。

【請求項7】 クローニングにより得られることを特徴とする、請求項1、3又は5記載のDNA。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか一項記載のDNAを組込んだ発現分泌ベクター。

【請求項9】 pCMTA-BTGである請求項8記載の発現分泌ベクター。

【請求項10】 pNJ1053-proBTGである請求項8記載の発現分泌ベクター。

【請求項11】 pNJ1053-BTGである請求項8記載の発現分泌ベクター。

【請求項12】 pIJ702-BTGである請求項8記載の発現分泌ベクター。

【請求項13】 請求項8～12のいずれか一項記載の発現分泌ベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項14】 大腸菌であることを特徴とする請求項13記載の形質転換体。

【請求項15】 酵母であることを特徴とする請求項13記載の形質転換体。

【請求項16】 放線菌であることを特徴とする請求項13記載の形質転換体。

【請求項17】 請求項13～16のいずれか一項記載の形質転換体を培養することを特徴とする、トランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、トランスグルタミナーゼをコードするDNA遺伝子、該遺伝子を組込んだプラスミド、該プラスミドが導入された形質転換体及び該形質転換体を培養することを特徴とする、トランスグルタミナーゼの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 トランスグルタミナーゼ（以下、「BTG」と略する。）は、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。

【0003】 このトランスグルタミナーゼは、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基の ϵ -アミノ基が作用すると、分子内及び分子間に ϵ - $(\gamma$ -Gln)-Lys架橋結合が形成される。また水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されグルタミン酸残基になる反応を進行させる酵素である。

【0004】 トランスグルタミナーゼは、ゲル状食品、ゲル状化粧品をはじめとしてヨーグルト、ゼリー及びチーズなどを製造する際に用いられている（特公平1-50382号）。

【0005】 更に、熱に安定な、マイクロカプセルの素材、固定化酵素等の担体などを製造する際にも利用されている。

【0006】 トランスグルタミナーゼはこれまで動物由来のものが知られている。例えばモルモットの肝臓 [Connellan, et al., Journal of Biological Chemistry 246巻4号, 1093～1098頁(1971)] 及び哺乳動物の臓器、血液に広く分布し [Folk et al., Advances in Enzymology 38巻, 109～191頁(1973); Folk et al., Advances in Protein Chemistry 31巻, 1～133頁(1977)]、その酵素の特徴も研究されている。

【0007】 更に、ストレプトベルチシリウム属の菌から、上記動物由来のトランスグルタミナーゼとは異なり、カルシウム (Ca^{2+}) 非依存性のトランスグルタミナーゼが発見されている。同属菌の具体例としては、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム (Streptovorticillium griseocarneum) IFO 12776、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム (Streptovorticillium cinnamoneum sub sp. cinnamoneum) IFO 12852、ストレプトベルチシリウム・モバラエンス (Streptovorticillium mobaraense) IFO 13819等があげられている（特開昭64-27471号参照）。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 従来、トランスグルタミナーゼは動物、菌類等から製造されているため、供給量、供給費用等の点で改善すべき点が多くあった。

【0009】 本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意

研究の結果、トランスグルタミナーゼをコードするDNAを精製・単離し、その塩基配列を決定することに成功した。かかる成果に基づいて、遺伝子工学的手法により、大腸菌等の微生物を用いて該DNAを発現させ、トランスグルタミナーゼの効率的な大量生産への途を開いたものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、トランスグルタミナーゼをコードするDNAを提供するものである。

【0011】即ち、アミノ酸の一字記号で表したとき、下記の第1表のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを提供するものである。

【0012】

【表6】

第 1 表			
10	20	30	40
DDDDITTPA EPLDDEPDT DDTGDRATV VHTIEKPSQ			
50	60	70	80
VTSRDCRER DTRDGRRL STCCVCTTV DSCOTDRL			
90	100	110	120
APADDDPDT ENLDRGRD DTRDGRPS DYAKSPDS			
130	140	150	160
ICPQARSTV SYRDRALRA DRRATLDEL KRLALGDDA			
170	180	190	200
LDRDARSPP YSALRRTTV KRRDGRDPP DRRAVITSE			
210	220	230	240
DPTGQDLSS SARERTGCP DAPRPAPTC LVDRDGRRI			
250	260	270	280
PRPTTPGEC PTPPTGPPC AQTRADAPT VTECHETRA			
290	300	310	320
PRGLGAREY TRSDRDRSE GTSDFDGCAT VITPLRSDH			
330			
TAPDTEGCV P			

かかるDNAは、遺伝コドンの縮重を考慮すると、種々の塩基配列を包含し得るものである。

【0013】これらの塩基配列は、遺伝子発現系の諸要素、例えば宿主細胞の種類等に応じた優先コドン等によって当業者が容易に選択し得るものである。

【0014】その一具体例として、大腸菌又は酵母を宿主細胞として用いる発現系に適した塩基配列の一例を第2表に示す（配列番号1）。

【0015】

【表7】第 2 表

GAT TCT GAT GAC AGA GTC ACT CCA CCA GCT
GAA CCA TTG GAT AGA ATG CCA GAT CCA TAC
AGA CCA TCT TAC GGT AGA GCT GAA ACT GTT
GTC AAC AAC TAC ATT AGA AAG TGG CAA CAA
GTC TAC TCT CAC AGA GAT GGT AGA AAG CAA
CAA ATG ACT GAA GAA CAA AGA GAA TGG TTG

50

TCT TAC GGT TGT GTT GGT GTT ACT TGG GTT
AAC TCT GGT CAA TAC CCA ACT AAC AGA TTG
GCT TTC GCT TCT TTC GAT GAA GAT AGA TTC
AAG AAC GAA TTG AAG AAC GGT AGA CCA AGA
TCC GGT GAA ACT AGA GCT GAA TTC GAA GGT
AGA GTT GCT AAG GAA TCT TTC GAT GAA GAA
AAG GGT TTC CAA AGA GCT AGA GAA GTT GCT
TCT GTT ATG AAC AGA GCT CTA GAA AAC GCT
CAC GAT GAA TCT GCT TAC TTG GAT AAC TTG
10 AAG AAG GAA TTG GCC AAC GGT AAC GAT GCT
TTG AGA AAC GAA GAT GCT AGA TCC CCA TTC
TAC TCT GCT TTG AGA AAC ACT CCA TCT TTC
AAG GAA AGA AAC GGT GGT AAC CAC GAT CCA
TCC AGA ATG AAG GCT GTT ATT TAC TCT AAG
CAC TTC TGG TCT GGT CAA GAT AGA TCT TCT
TCT GCT GAT AAG AGA AAG TAC GGT GAT CCA
GAT GCT TTC AGA CCA GCT CCA GGT ACC GGT
TTG GTC GAC ATG TCC AGA GAT AGA AAC ATT
CCA AGA TCC CCA ACT TCT CCA GGT GAA GGT
20 TTC GTC AAC TTC GAT TAC GGT TGG TTC GGT
GCT CAA ACT GAA GCT GAT GCT GAT AAG ACT
GTT TGG ACC CAT GGT AAC CAC TAC CAC GCT
CCA AAC GGT TCT TTG GGT GCT ATG CAC GTC
TAC GAA TCT AAG TTC AGA AAC TGG TCT GAA
GGT TAC TCT GAT TTC GAT AGA GGT GCT TAC
GTT ATT ACT TTC ATT CCA AAG TCT TGG AAC
ACT GCT CCA GAC AAG GTC AAG CAA GGT TGG
CCA

第1表に示したDNAは従来公知の化学的合成法等により調製することができる。

【0018】本発明は更に、第1表に示したアミノ酸配列をコードするDNAの5'末端に、以下の第3表に示す、シグナルペプチドを含むアミノ酸配列の全部又は一部をコードする塩基配列を含むDNAをも提供するものである。

【0017】

【表8】

第 3 表			
-75	-70	-60	-50
MTTD	HALVPATHA	VTAPDGRS	PAEPTTHAR
-40	-30	-20	-10
GRDPTTTPP	TASDRTTTR	GRAGSAPAA	TAAGTTPAP

上記DNAも遺伝子コドンの縮重により種々の塩基配列を包含し得るものである。一具体例としては、第2表に示した塩基配列の5'末端に以下に示す塩基配列（配列番号2）を有するものが挙げられる。

【0018】

【表9】

AAGAGAGATCTCCAACCTCCAAAGCCAACTGCTTCTAGAAGAATGACTTCTAGACACCAA
 AGAGCTCAAAGATCTGCTCCAGCTGCTTCTTCTGCTGCTCCATCTTTGAGAGCTCCA

また、その取得方法も化学的合成法も含めて種々のものが考えられる。例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法により得られたDNA断片をプローブとして用いて放線菌のゲノムDNA等からクローニングすることにより得ることができる。このようにして得られたト*

* ランスグルタミナーゼの構造遺伝子及び5' 末端上流部分を含むDNAの塩基配列の一例を第4表に示す。
 {0019}
 {表10}

第 4 表

ATGCGCTATA CCGCGAGGCC TCTCGTCTTC GCCACTATGA GTGCGGTTTA TGCACCGCCG
 GATTTCATGCC GTGCGCCCGC GAGGCCCGCG CCGACAATGG CCGCGGGGAA GAGACGAAGT
 CCTACGCCGA AACCTACCGC CTCACGCCCG ATGACGTGGC GACATCAACG CGCTCAACGA
 AGCGCTCCCG CCGCTTCGAG CCGCGGCCCG TCGTTCCCGG CCGCGGACTC CGAGGACAGG
 GTCACCCCTC CCGCGGAGCC GCTCGACAGG ATGCCCGACC CGTACCGTCC CTCGTACCGC
 AGCGCCGAGA CCGTCGTCAA CAACTACATA CGCAAGTGCC AGCAGGTCTA CAGCCACCCC
 GACCGGAGGA AGCAGCAGAT GACCGAGGAG CAACCGGAGT GGTGTCTCTA CGGCTCGGTC
 GGTGTCACTT GGTCAATTG GGTCAAGTAC CCGCAGAAC GACTGCGCTT CCGTCTCTTC
 GACGAGACA GGTTCAGAA CGAGCTGAAG AACCGCAGCC CCGCGTCCCG CGAGACCGCG
 GCGGAGTTCG AGCGCCCGGT CCGGAAGGAG AGCTTTGATG AAGAGAAGCG GTTCCAGCGG
 GCGCGTGAGG TGCGGTCCGT GATGAACAGG CCGCTGAGGA ACCGCCACGA CGAGAGCGCT
 TACCTCGACA ACCTCAAGAA GGAAGTGGC AACCGCAACG ACGCGCTGCG CAACGAGGAC
 GCGCGTTCCC CGTCTACTC GCGCGTCCCG AACACCCCGT CCTTTAAGGA GCGGAACCGA
 GGCAATCAGC ACCCGTCCAG GATGAAGGCC GTCATCTACT CGAAGCACTT CTGGAGCGCC
 CAGGACCGGT CGAGTTCGCG CGACAAGAGG AAGTACGGCG ACCCGAGCCG TTTCCGCCCG
 GCGCGCGGGA CCGCGCTCGT CGACATGTCG AGGAGACGGA ACATTECCCG CAGCCCGACC
 AGCGCGCGTG AGGATTGCT CAATTTGAC TACCGCTGCT TCGCGGCCCA GACCGAAGCG
 GACCGCGACA AGACCGTCTG GACCGACGGA AATCACTATC ACGCGCCCAA TGCGACCTTT
 GGTCCCATCC ATGTATACGA GAGCAAGTTC CGCAACTGGT CCGAAGGTTA CTCGCACTTC
 GACCGCGGAG CCTATGTGAT CACCTTCATC CCGAAGAGCT CGAACACCCG CCGCGACAAG
 GTAAGCAGG GCTGCGCG

本発明はまた、トランスグルタミナーゼの発現分泌用に使用することのできるベクターを提供するものである。

{0020} かかるベクターは、所望の発現系に応じた公知の発現用ベクターに、第1表ないし第4表に示す塩基配列を含むDNAを従来公知の方法によって挿入することにより調製することが可能である。

{0021} 本発明の発現分泌ベクターの調製に用いることのできる公知の発現ベクターとしては、例えば大腸菌宿主用として PIN-III -ompA₁ 等を挙げることができる。PIN-III -ompA₁ に本発明のDNAを組み込んで得られた本発明の発現分泌ベクターの一具体例としては pCMPA-BTGがある。さらに、放線菌宿主用として、pIJ702、酵母宿主用として、pNJ1053 が挙げられる。これらの発現ベクターに本発明のDNAを組み込んで得られた本発明の発現分泌ベクターの具体例としてはpIJ702-BTG、pNJ1053-proBTG、pNJ1053-BTG がある。

{0022} 更に、本発明は、トランスグルタミナーゼ遺伝子を担持する発現分泌ベクターを導入することにより得られた形質転換された種々の形質転換体に関する。

{0023} 該形質転換体となり得る細胞には、大腸菌及び放線菌等の原核細胞並びに酵母等の真核細胞が考

られる。

{0024} 大腸菌の一具体例としてはJ・A 221 株 (hsdM⁻, trpE5, leuB6, lacY, recA/F⁻, lacI⁻, lac⁻, pro⁻) がある。

{0025} かかる大腸菌J・A 221 株に本発明のベクターである pCMPA-BTGを導入することにより形質転換して得られた形質転換体AJ12569 は、平成2年9月28日付で工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている (受託番号FERM BP-3558)。

{0026} 放線菌の一具体例としては Streptomyces lividans 3131 からチオストレプトン感受性株として得た Streptomyces lividans 3131-TSがある。

{0027} かかるStreptomyces lividans 3131-TS に本発明のベクターであるpIJ702-BTGを導入することにより形質転換して得られた形質転換体Streptomyces lividans AKW-1 は、平成3年9月30日付で工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている (受託番号FERM BP-3586)。

{0028} 酵母の一具体例としては Saccharomyces cerevisiae KSC22-1C (MATa, ssl1, leu2, his⁻, ura3) がある。

【0029】かかる *Saccharomyces cerevisiae* KSC 22-1C に本発明のベクターである pNJ1053-proBTG を導入することにより形質転換して得られた形質転換体 *Saccharomyces cerevisiae* AJ 14669 は、平成3年9月30日付で工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている（受託番号 FERM BP-3585）。

【0030】最後に、本発明は、上記の形質転換体を培養することにより、トランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質を製造する方法に関する。

【0031】培養条件は、形質転換体の種類に応じて当業者が適宜決定し得るものである。また必要に応じて IPTG 等の物質を培地に添加することにより、所望遺伝子の発現を誘導することもできる。発現分泌された該タンパク質は、培養上清及び宿主細胞のペリプラズム更には細胞質中から従来公知の種々の方法で単離・精製することが可能である。

【0032】以下、実施例を参照しつつ、本発明を更に詳しく説明する。

【0033】

【実施例】

実施例1：BTG遺伝子のクローニング

(1) 菌体の取得

放線菌 *Streptovercillium* sp. を以下の培地条件で 30℃ で 5 日間培養した。

【0034】[GP 培地]

グリセロール	0.4 wt%
ペプトン	0.1 wt%
イースト・エキス	0.4 wt%
硫酸マグネシウム	0.05 wt%
リン酸-カリウム	0.2 wt%
リン酸二ナトリウム	0.5 wt%
グリシン	0.1 wt% / 1 l

(2) 菌体からの DNA の取得

上記条件下で培養したのち、培養培地 400ml を遠心分離 (12,000g, 4℃, 10分間) し、これを 50mM Tris-HCl (pH8.0)-5mM EDTA-50mM NaCl (以下「TES」という。) に懸濁した。次のこの懸濁液を、遠心分離 (1,100g, 室温, 10分間) し、上清を捨てた。得られた沈殿 (菌体) を 2mg/ml の リゾチーム (シグマ社) を含む TES 5ml に懸濁し、これを 37℃ で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、これをアセトン-ドライアイス中につけ急激に凍らせ、42ml の 100mM Tris-HCl (pH9.0) -1% SDS-100mM NaCl (以下「Tris-SDS」という。) を *

* 加え、よく懸濁した。更にこれを 60℃ で 20 分間インキュベートし、アセトン-ドライアイス中に 10 分間つけた。次にこれを再度 60℃ でインキュベートしたのち、これを Tris-SDS で飽和したフェノールで抽出した。この抽出を 2 回繰り返して、得られたものに 2 倍容量のエタノールを加えた。このとき、菌体の DNA は糸状となるので、これをガラス棒で巻き取り回収した。回収した DNA を 80% エタノールで 1 回洗浄し、アスピレーターとデシケーターを用いて乾燥した。乾燥後 DNA を 10mM Tris-HCl (pH8.0)-1mM EDTA (以下「TE」という。) 5ml に溶かした。

【0035】次に DNA サンプル中の RNA を分解し除いた。RNA の分解は DNA を 5ml の TE に溶かしたサンプルに、RNase A (シグマ社) 1mg/ml 及び RNase TI (ベーリンガー・マンハイム社) 2000 u/ml を含む溶液を 0.5ml 加え 37℃ で 30 分間インキュベートすることにより行なった。インキュベートの後、サンプルを TE 飽和フェノール・クロロホルムとクロロホルムで 1 回ずつ抽出し、最後に得られた水層に 1/10 容量の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 溶液と 2 倍容量のエタノールを加え、-80℃ に 30 分間おいた。その後、遠心分離 (12,000g, 4℃, 15分間) により沈殿を回収し、沈殿を 70% エタノールで洗浄し、乾燥させた。これを TE 4ml に溶かし以下の実験に使用した。最終的に得られた DNA 量は約 4mg であった。

【0036】(3) PCR (Polymerase Chain Reaction) 法による DNA 断片の取得

BTG 遺伝子を含む特定の DNA 領域を、最近開発されてきた PCR 法によって、単離増幅した (Saiki, R.F. et al. (1985) Science 230, 1350-1354, Mullis, K.B. 及び Faloona, F.A. (1987) Methods in Enzymology, 155, 335-350)。

【0037】(i) PCR 法に用いた Primer DNA の合成
大阪大学蛋白質研究所、下西研究室において決定された、BTG 蛋白のアミノ酸配列の 117 番目のフェニルアラニンから 123 番目のフェニルアラニンに対応する塩基配列を予想し、DNA を合成した。(DNA 合成は、ミリジェン・バイオサーチ社のサイクロプラス DNA 合成機を使用した。)

この DNA を PCR の Primer #1 とした。

【0038】Primer #1 の配列を以下に示す。

【0039】

【表 11】

5'-TT^T_C GA^T_C GA^A_G GA^A_G AA^A_G GG^T_T 3'

(20mer, 32mix, 1=1)

mer #2 の配列を以下に示す。

【0041】

【表 12】

【0040】次に 325 番目のリジンから 331 番目のプロリンに相当する塩基配列を予想し、同様に DNA を合成した。この DNA を PCR の Primer #2 とした。Pri

5'-GGC CAI CC_C^T TG_C^T TTI AC_C^T TT-3'

(20mer, 8mix, I=2)

【0042】合成したDNAはそれぞれ20μMの濃度になるようにTEに溶解した。

【0043】(ii) PCR法によるDNA断片の増幅反応は、(株)パーキンエルマージャパン社のGene Amp™ kitを用い、同社のDNA Thermal Cycler (DNA*

*増幅装置)により行なった。反応溶液の組成は以下の通りである。

【0044】

【表13】

(終濃度)

H ₂ O	53.5μl
[10x] Reaction buffer	10μl [1x]
dNTPs, Mix 1.25mM	16μl 200 μM
(i) のPrimer #1	5μl 1.0 μM
(i) のPrimer #2	5μl 1.0 μM
* template(BTG DNA 0.5μg)	10μl
AmpliTaq™ DNA polymerase	0.5μl 2.5u/assay
計	100 μl

* (2) で得たDNAを 0.5μg/10μl になるようにTEにとかしたものを。

【0045】上記の反応液 100μl を混合し、ミネラルオイル (Sigma 社) 100μl を加えた。次に反応液の入ったチューブをDNA thermal Cycler にセットし、以下の条件で反応を行なった。

【0046】95℃ 1分
37℃ 2分
72℃ 3分

この条件下で反応を35サイクル行なった後、更に72℃で7分間インキュベートした。

【0047】(iii) 増幅されたDNAの回収
反応後、ミネラルオイルを除き、100μl のクロロホルムを加え、混合し、15,000回転/分、2分間の遠心分離 (トミー精工社製) を行ない、上清を100μl 回収した。このうち10μl を用い、1.5%アガロース電気泳動で回収されたDNAのサイズと量を確認した。その結果645 bpのDNA断片が、約2μg増幅されていることがわかった。

【0048】残りの90μl を 1.5%低融点アガロース電気泳動にかけ、645 bpに相当するバンドを切り出し、65℃でとかした後等量のフェノールを加え混合し、遠心後、水層部分をさらにフェノール/クロロホルム及びクロロホルムで順次処理した後、水層に3M酢酸ナトリウムを8%になるように加え、エタノールを2倍量加え、-80℃で15分間置いた。次に15,000回転/分、10分間4℃の遠心後、沈殿を20μl の水にとかした。この操作で約1μgのDNA断片が回収された。

【0049】(4) PCRで増幅されたDNAの構造確認

上記のPCRで増幅されたDNA断片がBTG遺伝子の一部であるかどうかを確認するために、このDNA断片 0.4μgを用いてダイレクトシーケンスを行なった。その方法は下記に示すもので、シーケンスのプライマーは

PCRに用いた前述の#1を用いた。

20 【0050】-準備-

1. DNAシーケンシング用試薬：基本的にはdideoxy法を用いた。米国USB社のシーケンス用キットであるSequenase™ (version 2.0) を使用した。

【0051】2. シーケンシングのためのプライマーの標識：PCR反応に用いたprimer #1 を2 pmol用意し、T4 Kinase(TOYOBO) で5'末端を[γ-³²P]で標識した(比活性3000Ci/mmolの[γ-³²P] ATPを用いた)。標識したプライマーから適当なミニカラムなどを通してフリーの[γ-³²P] ATPを除いた。

30 【0052】3. シーケンス反応液(3.25μl 中) : Sequenase Kit を用いて4本のチューブに各G, A, T, C反応用のものを別々に調製した。

【0053】2.5 μl G,A,T,C,termination mix
0.38μl 5×buffer
0.22μl 0.1M DTT
0.15μl Sequenase (2ユニット)

-反応-

1. 0.4μgの増幅したDNAと2 pmolの[³²P] 標識したプライマーを12μl のTEに溶かし、95℃で5分間熱変性した後、氷水中で急冷した。

40 【0054】2. 直ちに(1) の溶液を 2.8μl ずつ4本のチューブに取り、3.25μl の各シーケンス反応液を加えて37℃で10分間インキュベートした。4μl の反応停止液を加え、75~80℃で2分間加熱した後シーケンシングで泳動した。

【0055】ダイレクトシーケンスの結果、この断片にBTGのアミノ酸配列の129番目のバリンから149番目のアスパラギンまでのアミノ酸配列をコードする塩基配列が見出された。したがって、この断片はBTG遺伝子の一部と推定された。

【0056】(5) PCRで増幅されたDNA断片のpUC19へのサブクローニング

次にPCRで増幅されたDNA断片をpUC19のSmaIサイトにサブクローニングした。そのためにまずPCRで得られたDNA断片の両末端を平滑化した。平滑化反応はBlunting kit (宝酒造)を用いて下記のように行なった。

【0057】1. ミクロ遠心チューブに以下の反応液を調製し、全量を9μlにした。

【0058】DNA断片 8μl (0.4μg)
10×buffer 1μl

2. DNA末端のアニーリングを防ぐため、70°Cで5分間保温した後、37°Cの恒温槽に移した。

【0059】3. T4 DNA polymeraseを1μl加え、ピペティングにより穏やかに混和した。

【0060】4. 37°Cで5分間保温した。

【0061】5. DNA dilution bufferを最終濃度1μg DNA/50μlになるように加え、ボルテックスで激しく攪拌した。

*

第 5 表

TCCGTGATGA ACAGGGCCCT GGAGAAAGCC CACGACGAGA GCGCTTACCT CGACAACCTC
AAGAAGGAAC TGCCGAACGG CAACGACGCC CTGCGCAACG AGGACGCCCG TTCGCCGTTT
TACTCGGCCG TGCCGAACAC GCGCTCCTTT AAGGACCGGA ACGGAGCGAA TCACGACCCG
TCCAGGATGA AGCCCGTCAT CTACTCGAAG CACTTCTGGA GCGGCCAGGA CCGGTGAGT
TCCGCCGACA AGAGGAAGTA CCGCGACCCG GACGCTTTCC GCGCCGCCCG CCGGACCCCG
CTGTCGACA TGTCGAGCGA CAGGAACATT CCGCGACGCC CCACGACCCC CGGTGAGGGA
TTCGTCAATT TCGACTACCG CTGGTTGGCG GCCCAGACCG AAGCGGACCC CGACAAGACC
GTCTGGACCC ACGGAAATCA CTATCAGCGG CCAATGGCA GCCTTGGTGC CATCCATGTA
TACGAGAGCA AGTTCCGCAA CTGGTCCGAA GGTACTCCG ACTTCGACCG CGGACCTAT
GTGATCACCT TCATCCCCAA GAGC

(6) ライブラリーの作製

1. Streptovorticillium sp. 染色体DNAの部分分解
染色体DNA 24μg、BamHI 10×buffer (TOYOBO 10× High buffer) 60μlに滅菌水を加えTotal 594 μlとし、混合した。

【0065】・ 37°Cで5分間予熱した。

【0066】・ BamHI (TOYOBO製)を6μl加え、混合し、37°C、10分間反応した。

【0067】・ 65°C、15分間熱処理し、酵素を失活させた。

【0068】2. クローニング (STRATAGENE製 EMBL3 CLONING KIT 使用)

i) ligation

・ 上記DNA部分分解物25μlをエタノール沈殿し、2.5μlのTEに溶解した。

【0069】・ 1.0μl EMBL3 predigested arms (1μg/μl)、0.5μl 10×ligationbuffer、0.5μl 10mM ATP (pH 7.5)、0.5μl T4 DNA ligase (8 units/μl, Boehringer Mannheim 製)を加え混合し、4°Cで一晩反応した。

* 【0062】得られたDNA断片をpUC19をSmaIで切断したものと、ライゲーションを行ない、大腸菌DH5αを、5-ブロモ-1-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド (X-gal) 及びイソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) 存在下で形質転換した。アンピシリン耐性白色コロニーから得られた、PCRで増幅されたDNA断片がSmaIサイトに組み込まれたプラスミドをpUC 19 BTGと名付け以下の実験に使用した。なおライゲーションには、ライゲーションキット (宝酒造)を用いた。

【0063】次に、PCRで増幅されたDNA断片のより広範囲の塩基配列を知るために、上記pUC19BTGを鋳型として、DNAシーケンスを行なった。DNAシーケンスは7-deaza dGTP仕様のシーケンスキット (USB社)を用いる従来公知の方法で行なった。その結果、以下の第5表に示す564bpの塩基配列が明らかとなった。

【0064】

【表14】

【0070】10×ligation buffer

500mM Tris-HCl, pH 7.5

70mM MgCl₂

10mM DTT

ii) Packaging (STRATAGENE製 GIGAPACK II COLD PACKAGING EXTRACT 使用)

1. 適当量の抽出物を-70°Cのフリーザーからドライアイス上に移し、同時に、音波抽出物を溶かし始めた。

【0071】2. 指の間で、調度融け始めるまで凍結/融解抽出物を暖めた。

【0072】3. 凍結/融解抽出物に上記DNA溶液4μl (1.6μg含有)を加え氷上に置いた。

【0073】4. DNAを含む凍結/融解抽出物に速やかに音波抽出物15μlを加えた。

【0074】5. 泡立てないように攪拌し良く混合した。

【0075】6. 4,000gで5秒間遠心し、内容物全てをチューブの底に集めた。

【0076】7. 室温 (22°C)で2時間インキュベートした。

50

【0077】8. ファージ希釈用バッファー 500 μ l を加えた。

【0078】9. クロロホルム20 μ l を加え、静かに混合した。10. 4,000 g で5秒間遠心し、デブリスを沈降させた。

【0079】11. 上清を集め4℃で保存した。

【0080】ファージ希釈用バッファー (1 l 当り)

5.8 g NaCl
2.0 g MgSO₄
50ml 1M Tris-HCl, pH7.5
5ml 2% gelatin
autoclave

iii) plating

1. 大腸菌 P2392 を T B 培地に接種した。

【0081】P2392 の性状は hsd R514(rk-, mk+) sup E 44, sup F58, lacY1, or Δ (lac IZY), gal K2, gal T2 2, met B1, trp R55, (P2)。また T B 培地の組成は、5g / l NaCl, -10g / l Bactotryptone である。

【0082】2. P2392 を T B 培地中で 37℃ で振盪培養した。

【0083】3. OD₅₅₀ = 0.5 で、菌体を遠心分離 (1, 100g, 15分間、室温) により集めて、10mM MgSO₄ に OD₅₅₀ = 0.5 となるように懸濁した。

【0084】4. (ii)-11 の上清を少量加え、37℃ 15分間インキュベートした。

【0085】5. あらかじめ溶かしてあたためておいた top agarose (NaCl 5g / l, MgSO₄ · H₂O 2g / l, Yeast Extract 5g / l, NZ Amine 10g / l, Agarose 0.7%) 8ml と混合し、NZY プレート上に重層した。(NZY プレート: NaCl 5g / l, MgSO₄ · H₂O 2g / l, Yeast Ext 5g / l, NZ Amine 10g / l, Agar 15g / l)。

【0086】6. 37℃ で 1 晩インキュベートした。

【0087】この結果 3.0 × 10⁶ インデペンデントクローンよりなるライブラリーが作製できた。

【0088】(7) B T G 遺伝子のスクリーニング (8) で得られたライブラリーを用いて B T G 遺伝子のクローニングを行なった。(8) -(iii) に示した方法で、ライブラリー中のファージのプレーティングを行なった。一晩 37℃ で培養後、ブラックを形成させ、ファージのリフティングを行なった。ファージのリフティングは次のように行なった。

【0089】1. プレート を 4℃ に数時間おいた。

【0090】2. プレート表面 (トップアガロース表面) にニトロセルロースフィルターを密着させた (ニトロセルロースフィルター (S & S))。

【0091】3. そのまま約 2 分間放置した。

【0092】4. ニトロセルロースフィルターをはがし、0.5M NaOH-1.5M NaCl に 1 分間浸した。

【0093】5. ニトロセルロースフィルターを 1.5M Na

Cl-1M Tris-HCl (pH7.5) に 5 分間浸した。

【0094】6. ニトロセルロースフィルターを 2×SSC (1×SSC = 0.15M NaCl 0.015M Na-Citrate, pH7.0) に 30 秒間浸した。

【0095】7. 3MM 口紙上でニトロセルロースを風乾した。

【0096】8. 3MM 口紙にはさみ、80℃ で 2 時間 Baking を行なった。

【0097】リフティングを行なった後、pUC 19 BTO の EcoRI, HindIII で分解して得られる 650 bp のフラグメントを ³²P でラベルしたものをプローブとして用いて、ハイブリダイゼーションを行なった。この EcoRI, HindIII で分解して得られる 650bp のフラグメントは、PCR により増幅された DNA 断片を完全に含んでいる。また、フラグメントの ³²P の標識はマルチプライム DNA 標識セット (アマシャム) を用いて行なった。プローブの比活性は 3 × 10⁶ cpm / μ g -DNA であった。ハイブリダイゼーションの条件は以下の通りであった。

【0098】プレハイブリダイゼーション: ハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド, 1×Denhardt's (0.02% BSA, 0.02% Ficoll, 0.02% ポリビニルピロリドン), 0.1% SDS, 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.5), 200 μ g / μ l 変性サケ精巣 DNA) 中 42℃, 1 晩インキュベートした。

【0099】ハイブリダイゼーション: ハイブリダイゼーション溶液中で、プローブ濃度を 2 ng / ml として、42℃ で、1 晩インキュベートした。

【0100】洗 浄

1. 2×SSC, 0.1% SDS 5分 × 3 回、室温

2. 1×SSC, 0.1% SDS 1時間 × 2 回、68℃

洗浄後ニトロセルロースフィルターを風乾し、オートラジオグラムをとった。

【0101】以上の一連の操作で、初めに約 4 万個のブラックについてスクリーニングを行なった (ファーストスクリーニング)。この結果 16 個の強いシグナルを示すクローンを得た。これらのクローンをシングルブラックとして得るために、これら 16 個のクローンについて更にスクリーニングを行なった。この結果 6 個のシングルブラック化された、強いシグナルを示すクローンを得た。

【0102】(8) クローン DNA の構造解析 得られた 6 つのクローンの DNA の構造を調べるために、6 つのクローンより DNA を調製した。DNA の調製法は "Molecular Cloning, a laboratory manual 2nd Edition" に従って行なった。

【0103】このようにして得られた DNA から制限酵素 BamHI, SphI, NcoI, BglII, KpnI (いずれも TOYOBO) を用いて制限酵素地図を作製した。その結果、これらのクローンは、ほぼ同一の DNA 断片を含んでおり、その制限酵素地図は第 1 図のように決まった。

【0104】次に、それぞれの制限酵素で DNA を切断

し、電気泳動し、DNAをニトロセルロースフィルターに固定し、先にBTG遺伝子のスクリーニングで用いたプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションの条件はBTG遺伝子のスクリーニングで用いた条件と同じとした。

【0105】その結果、プローブにハイブリダイズして強いシグナルを与えるのはマップ上のNcoI 3.6kbp断片であることがわかった。したがって、少なくともBTG遺伝子の一部はNcoI断片にあると考えられた。

【0108】(9) NcoI 3.6kbp断片のサブクローニング

次に、NcoI 3.6kbp断片をプラスミドにサブクローニングすることにした。得られたファージクローンのDNAをNcoIで切断し、3.6kbpのDNA断片を低融点アガロースを用いて回収した。このNcoI断片を、プラスミド pTV 118N (宝酒造) をNcoIで切断したDNAとライゲーション*

ンさせ、このDNAで大腸菌DH5 α を形質転換した。得られた形質転換体より、pTV118N/NcoI 3.6kbp断片がサブクローニングされたプラスミド pTV118 NcoIを得た。

【0107】(10) BTG遺伝子のDNAシーケンス
得られたpTV118 NcoIを鋳型として、DNAシーケンスを行なった。その方法は(4)の項で説明した手法と同様の方法を用いた。ただしここでは反応温度を48°Cとし、更にシーケンスのコンプレッションの程度によっては反応系にSSB (Single Stranded DNA Binding Protein; TOYOBO) を加えた。

【0108】下記の第6表に求められた塩基配列を示す(配列番号3)。

【0109】

【表15】

第 6 表

TGCGGGGACG CGTAGGCAAT GGGGGTTCAT CGGACGTCG TTCGCGACGG CCGCGTTCAA

CGATGTTCCA CGACAAAGGA GTTGCAAGTT TCCATGCGCT ATACCCCGGA GGCTCTCGTC
TTCGCCACTA TGAGTGCGGT TTATGCAACG CCGGATTTCAT CCGGTCGGCC GCGGAGGCGG
CCGCCGACAA TGCGCGCGCG GAAGAGACGA AGTCTACGC CGAACTCTAC CCGCTCACCG
CGGATGACGT CCGGACATCA ACCGCTCAA CGAAGCGCTC CCGCGCTTC GAGCGCGCGC
CGGCTGTTCC GCGCGCGCGA CTCGACGAC AGGCTCACCC CTCGCGCGCA GCGGCTCGAC
AGGATGCGCG ACCCGTACCG TCCCTGCTAC CGCAGCGCGG AGACGCTCGT CAACAACCTAC
ATACGCAAGT GCGAGCAAGT CTACAGCCAC CCGCAGCGCA GGAAGCAGCA GATGACCGAG
GAGCAACCGG AGTGGCTGTC CTACGCTGTC GTGCGGTGTA CCTGGGTCAA TTCGGGTGAG
TACCCACGCA ACAGACTGCG CTTCGCGTCC TTCGACGAGG ACAGGTTCAA GAACGAGCTG
AAGAACGCGA GCGCGCGGTC CCGCGAGACG CGCGCGGAGT TCGAGGCGCG CGTGGCGAAG

GAGAGCTTTG ATGAAGAGAA GCGGTTCCAG CCGCGCGGTG AGGTGCGGTC CGTGATGAAC
AGGCGCGCTG AGAAGCGCCA CGACGAGACG CTTTACCTCG ACAACCTCAA GAAAGAACTG
CGGAACGCGA ACAGCGCGCT GCGCAACGAG GACGCGCGTT CCGCGTTCTA CTCGCGCGTG
CGGAACGCGC CGTCTTTAA GAGCGGAAC GAGGCAATC ACAGCCGCTC CAGGATGAAG
CGGTCATCT ACTCGAAGCA CTTCTGAGC GCGCAGGACC GGTGAGTTT CCGCGACAAG
AGGAAGTACG GCGACCGCGA CCGTTTCCCG CCGCGCGCGG GAGCGCGGCT GGTGACATG
TCGAGGGACA GGAACATTCC CCGCAGCGCC ACCAGCGCGG GTGAGGATT CGTCAATTTT
GACTACGCGT GGTTCGCGCG CCAGACGAA CCGCAGCGCG ACAAGACCGT CTCGACCCAC
GGAATCACT ATCAGCGCGC CAATGCGAGC CTTGCTGCGA TCGATGTATA CGAGAGCAAG
TTCGCGCACT GGTCCGAAGG TTACTCGGAC TTCGACCGCG GAGCCTATGT GATCACCTTC

1218

ATCCCCAAGA GCTGGAACAC CCGCCCGGAC AAGGTAAAGC AGGCTGCGCC GTGATGTGAG

CG

塩基配列よりBTG遺伝子の開始コドン(1位のATG)と推定された。その理由は、(a) 1位の81b上流にストップコドンが存在し、BTG遺伝子のオープンリーディングフレームはこの位置より下流から始まると考えられる；(b) 1位のATGの13b上流には典型的なSD配列(5'-AAAGGAG-3')が存在する；(c) 1位の

ATGのメチオニンから約20アミノ酸の領域は比較的疎水性に富んだ部分で、シグナル配列様の配列を持つ；という以上の3点からである。

【0110】また、3'末側の1219位にはストップコドンが存在しておりBTGのC末は1216位のプロリンと考えられる。塩基配列より求められたオープンリーディング

グフレームで、アミノ酸シーケンスで求められたBTGのN末のアミノ酸の位置は226位のアスパラギン酸である。したがって、ここで求められたBTG遺伝子のオープンリーディングフレームはアミノ酸シーケンスから求めた構造に更に75個のアミノ酸が付加した構造をとっていることがわかった。

【0111】実施例2：BTG遺伝子の化学合成

BTG遺伝子の設計合成

前述の如く、明らかになったBTGの全アミノ酸配列をもとに、BTG遺伝子DNAを設計した。その際、大腸菌や酵母のコドン使用頻度(Ikemura, T. and Ozeki, H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47, 1087(1983))を考慮し、また、各フラグメント(1)~(5)の両端のDNA鎖には各フラグメントの集合連結させる時に用いる制限酵素の認識部位を配置した。

【0112】

【表16】

- (1) 5' -AAATC.....GTAAACA - 3'
3' - G.....CAATGTTTGA- 5'
EcoRI NotI HindIII
- (2) 5' -AAATCGTTAAC.....TCTAGAA - 3'
3' - GCAATTG.....AGATCTTTGA- 5'
EcoRI NotI XbaI HindIII
- (3) 5' -AAATCTCTAGA.....AGATCTA - 3'
3' - GAGATCT.....TCTAGATTGA- 5'
EcoRI XbaI SalI HindIII
- (4) 5' -AAATCAGATCT.....CCATGGA - 3'
3' - GTCTAGA.....GGTACCTTGA- 5'
EcoRI NotI NotI HindIII
- (5) 5' -AAATCCCATGG.....A - 3'
3' - GGGTACC.....TTTGA- 5'
EcoRI NotI HindIII

次に設計した遺伝子DNAをアブライドバイオシステム*

各オリゴヌクレオチド100pmole

(水中)	7.5μl
10x バッファー *	1μl
10mM ATP	1μl
ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造)	0.5μl (5ユニット)
	10 μl
* 10xバッファー	
650mM Tris-HCl(pH7.6)	
100mM MgCl ₂	
150mM ジチオスレイトール	
10mM スペルミジン	

上記組成をエッペンドルフチューブに入れ、37°C、1時間反応させた後、3分間煮沸により酵素を失活させた。次に相補的な対同志を5μlずつ混合し(トータル10μl)、90°Cの湯浴中に3分間煮たあと、自然に37°Cまで*

DNA 2対	20 μl
150mM ジチオスレイトール(DDT)	2 μl

* 本社のDNA合成機 380Aを用いてホスホアミダイト法で化学合成した。

【0113】現在のDNA合成機やDNA精製法の信頼性、操作性から判断して、1本あたりのDNA鎖は30~40塩基程度にした。まず、当該BTGは331アミノ酸、即ち、993塩基の遺伝子が少なくとも必要である。また2本鎖としてプラスミドに組み込む必要があるためその2倍のDNAを合成する必要がある。実際には終止コドンの導入や、各断片の連結のための制限酵素認識部位も必要なため、27本表裏で合計54本のDNA鎖を合成した。またプラスミドに組み込んだところで、塩基配列の確認が必要なので確実に塩基配列の決定が行なえる長さ(約200 bp)に分けてプラスミドに組み込む方が操作しやすい。

【0114】したがって遺伝子全体を一度に組み立てるのではなく、約200bpずつ5つのブロックに分けて最初のフラグメントの集合を行ない、そこで塩基配列の確認を行ってから全体を構築することにした。

【0115】BTG遺伝子(合成型)の構築

まず、5ブロックに分けた各フラグメント(約200 bp)の構築を行なった。化学合成によって得られるオリゴヌクレオチドの5'末端にはリン酸がついていないので、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端にリン酸をくっつけた。その際、各フラグメントの5'両末端に位置するDNA鎖のリン酸化は連結後に行なった。

【0116】

※で湯の温度を下げてアニーリングを行なった。そのあと、2対のDNA(20μl)の隣どうしをリガーゼを用いて連結した。

【0117】

上記組成をエッペンドルフチューブに入れ、16°C、30分間反応させた後、さらに隣どうしを連結して、ブロックをつなぎ合わせるため、上記反応液の各22μlずつを3本混合し(トータル66μl)、リガーゼ 0.5μlを加えた。16°C、30分間反応後、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、約200 bpのDNAフラグメントをゲルから回収した。

【0118】こうして得たDNAフラグメント(1)~(5)の5'末端にはEcoRI 認識部位、3'末端にはHindIII 認識部位がある。次に各フラグメントの5'両末端のリン酸化を行なった後、適当量をあらかじめEcoRIとHindIIIで切断処理したプラスミドpUC18(Yanisch-Perron, C.等, Gene, 33, 103(1985))と混合し、ライゲーションキット(宝酒造)を用いて16°C、1時間連結反応を行なった。

【0119】次にこの各混合物を大腸菌JM109株(recaA1, Δlacpro, endA1, gryA96, thi-1, hsdR17, supE4, relA1, λ⁻, (F' traD36, proAB, lacI⁺ Z ΔM15))に導入した。

【0120】E.coli JM109株はpUC系プラスミドDNAの形質転換やM13ファージベクターDNAの形質導入を行なう際に、ベクターDNAより生成するlacZαペプチドとJM109F'にコードされるlacZΔM15とによるβ-ガラクトシダーゼの活性回復を用いて、組換え体の選別を容易にする菌株である。即ち、IPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)とX-Gal(5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドール-β-D-ガラクトシド)を含む培地でプラスミドpUC18を保持するJM109株は、β-ガラクトシダーゼ活性を示す青色のコロニーとして出現するが、外来DNA断片が挿入された組換えプラスミドを保持するJM109株はβ-ガラクトシダーゼ活性が回復せず無色のコロニーとして出現する。

【0121】いくつかの無色のコロニーから、プラスミドを調製し、そのDNAシーケンシングを行ない(Sanger, F.ら, J.Mol.Biol., 143, 161(1980))、挿入された各フラグメントが設計した通りの正しい塩基配列を有するクローンを選択した。

【0122】さらに、各制限酵素認識部位をもちいて各フラグメントの連結を行なった。

【0123】まずフラグメント(2)と(3)の連結は、pUC18のアンピシリン耐性遺伝子内に存在するScaI認識部位を利用して、フラグメント(2)及び(3)をScaIとXbaIで切断後、BTG遺伝子を含むScaI・XbaI断片を用いて行なった。またフラグメント(4)と(5)の連結は同様にフラグメント(4)及び(5)をScaIとNcoIで切断後、BTG遺伝子を含むScaI・NcoI断片を用いて行なった。さらにフラグメント(2)(3)(4)(5)の連結は同様にフラグメン

ト(2)(3)集合体及び(4)(5)集合体をScaIとBglIIで切断後、BTG遺伝子を含むScaI・BglII断片を用いて行なった。

【0124】最後に、フラグメント(1)のEcoRI・HpaI断片とフラグメント(2)(3)(4)(5)の集合体のHpaI・HindIII断片をあらかじめEcoRIとHindIIIで切断処理した大腸菌用高発現分泌ベクターpIN-III-ompA2 (Ghrayeb, J.等, EMBO J., 3, 2437(1984))と混合し、ライゲーションキットを用いて、16°C30分間連結反応を行なった。次にこの混合物を大腸菌JA221株(hsdM⁻, trpE5, leuB6, lacY, recA/F⁻, lacI⁻, lac⁻, pro⁻)(Nakamura, K.等, J.Mol.Appl.Genet., 1, 289(1982))に導入した。生じたコロニーからいくつかのプラスミドを調製し、BTG遺伝子(約1 kb)が正しく挿入されたことを確認した。こうして得られたBTGの発現分泌ベクターをpOMPA-BTGと呼ぶ。挿入された化学合成型BTG遺伝子の塩基配列を第2表に示した。

【0125】なお、この実施例で用いたプラスミドpIN-III-ompA2は大腸菌の外膜リポタンパクのプロモーター(1pp^r)、及びラクトースオペロンのプロモーター、オペレーター(lac^o)、大腸菌の外膜タンパクOmpAのシグナルペプチドを含んでおり、この下流に組み込まれた遺伝子はIPTGの添加により発現が誘導され、遺伝子産物はペリプラズムに蓄積される。これまでにサチライシンをはじめ、いくつかの例で遺伝子産物がペリプラズムに蓄積することが報告されている(Ikemura, H.等, J.Biol.Chem., 262, 7859(1987), Hsiung, H.M.等, Bio/Technology, 4, 991(1986)など)。BTGタンパクの精製は常法どおり、ペリプラズムから浸透圧ショック法(Koshland, D.ら, Cell, 20, 749(1980))によってペリプラズム画分のタンパク質を抽出し、その後、硫酸沈殿、各種イオン交換クロマトグラフィ、ゲル濾過及びHPLC等の各操作を用いる生化学的手法により行なうことができる。

【0126】また、合成したBTG遺伝子の発現に用いるプラスミドとしては、pIN-III-ompAに限らず、他の発現プラスミドを用いることもできる。これらは、発現系に応じて当業者であれば容易に選択し得る。

【0127】実施例3: BTG遺伝子(合成型)の大腸菌での発現

合成型BTG遺伝子を組み込んだプラスミドpOMPA-BTGを保有する大腸菌JA221株(FERM P-11745)をアンピシリン50μg/mlを含むM9 カザミノ酸培地で37°C、2時間振盪培養後、培養温度を23°Cに下げ、IPTGを1mMとなるよう添加し、さらに4時間23°Cで振盪した。次いでこの培養液50mlを遠心分離により集菌後、菌体を20%シュークロース、10mM Tris-HCl(pH7.5) 2.5mlに懸濁し、

0.5M EDTA(pH8.0) 0.125mlを添加後、30分間氷中に放置した。12000 rpm、10分間遠心し、上澄と菌体を分離後、菌体画分を蒸留水3mlに懸濁し、30分間氷中に放置した。12000 rpm、10分間遠心し、上澄と菌体を分離した。次にこれらの上澄液を合わせて38000 rpm、60分間超遠心し、その上澄液をペリプラズム画分とした。

【0128】さらに菌体画分は蒸留水3mlに懸濁後、超音波破碎(200W、5分)を行ない、細胞質画分とした。

【0129】各画分のBTG活性の測定

調製した各画分(培養上清、ペリプラズム、細胞質)のBTG活性をヒドロキサム酸法により測定した。

【0130】測定方法は基本的には、J.Biol.Chem. 241 5518(1966)に記載のFolk and Coleの方法(Colorimetric hydroxamate Procedure)に準じて行なった。すなわち、ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシン(CBZ-gln-gly)とヒドロキシルアミンを基質としてCa²⁺存在下あるいは非存在下で反応を行ない、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯体として形成させ、525 nmの吸収を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め活性を算出する方法である。

【0131】<活性測定法>

試薬A

0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH 6.0)

0.1Mヒドロキシルアミン

0.05M 塩化カルシウム

0.01M 還元型グルタチオン

0.03M CBZ-gln-gly (国産化学製)

試薬B

3N 塩酸 1容

12%-トリクロロ酢酸 1容

5% FeCl₃・6H₂O(0.1N-HClに溶解) 1容

試料(酵素液)の0.4mlに試薬A 0.4ml加えて混合し、37℃で、10分間反応後、試薬B 0.4mlを加えて反応停止と鉄錯体の形成を行なった後、525 nmの吸光度を測定した。

【0132】対照として、予め、熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求め、別に酵素液のかわりにL-グルタミン酸γ-モノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、吸光度より、生成されたヒドロキサム酸の量を求め、1分間に1マイクロモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を1単位とした。

【0133】以下にその測定結果を示す。

*

[YEME培地+0.5%グリシン+50μg/mlチオストレプトン]

0.3% イースト・エキス

0.5% ペプトン

0.3% マルト・エキス

0.1% 塩化マグネシウム

1.0% グルコース

34.0% サッカロース

*【0134】

【表17】

試料	IPTG (mM)	BTG活性 (U/mg蛋白)
培養上清	—	0
	1	0.033
ペリプラズム	—	0
	1	0.22
細胞質	—	0
	1	0.033

いずれの画分にもIPTGで誘導すると微弱ながらBTG活性を検出することができた。

【0135】さらに、BTG遺伝子産物が生成していることを確認するため精製BTGを用いてウサギで作製した抗BTG抗体によるウェスタン・ブロッティングを、ベクター社のVectastain ABC kitを用いて行なった。

【0136】即ち、各画分からのタンパク 0.5μlずつをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、泳動後のゲルをメンブレン(Immobilon; ミリポア社)にトランスファーして抗原となるタンパク質をメンブレンに結合させた。その後、ウサギ抗BTG抗体(抗体価64倍のものを1000倍希釈した)によるウェスタンブロッティングを行ない、遺伝子産物をタンパクレベルで確認した。

【0137】その結果、以下の1、3、5及び7のレーンにおいて同一の位置に発色したバンドが現われ、いずれのIPTG添加画分でも抗BTG抗体との反応を示すタンパク質が、精製BTGと同一分子量の位置に検出できた。

【0138】1: 精製BTG(コントロール)

2: 培養上清(IPTG無添加)

3: 同上(IPTG 1mM添加)

4: ペリプラズム(IPTG無添加)

5: 同上(IPTG 1mM添加)

6: 細胞質(IPTG無添加)

7: 同上(IPTG 1mM添加)

実施例4: BTG遺伝子(天然型)の放線菌での発現

(1) プラスミドベクター(pIJ 702)の取得

pIJ 702 含有Streptomyces lividans 3131(ATCC 3528

7)を以下の培地条件で30℃、2日間培養した。

【0139】



25 -

0.5% グリシン

0.1% 50mg/mlチオストレプトン溶液

(シグマ:ジメチルスルホキシド溶液) /1 (pH7.0)

上記条件下で培養した培養地200mlを遠心分離(12,000g, 4℃, 10分間)し、得られた沈澱(菌体)を50mM Tris-HCl(pH 8.0)-5mM EDTA-50mM NaClで洗浄した。洗浄後、遠心分離(1,300g, 室温, 5分間)により得られた菌体を50mM Tris-HCl(pH 8.0)-10mM EDTA-25% Sucrose(以下「TE-Sucrose」という。)10mlに懸濁した。次に30mg/mlのリゾチーム(シグマ)を含むTE-Sucrose 2ml及び0.25M EDTA 4mlを加え、これを37℃で30分間インキュベートした。インキュベート後20% SDS 2mlを加えさらに9M NaCl 5mlを加え穏やかに攪拌した後、0℃で1晩インキュベートした。次に、遠心分離(100,000g, 4℃, 40分間)により得られた上清に30%ポリエチレングリコール6000を終濃度1.0%になるように加え、0℃で4.5時間インキュベートした。その後、遠心分離(900g, 4℃, 5分間)し、沈澱を10mM Tris-HCl(pH 8.0)-1mM EDTA-50mM NaClに溶かした。そして、塩化セシウム16.8g及び10mg/mlの濃度にエチジウムブロマイドを10mM Tris-HCl(pH 8.0)-1mM EDTA(以下「TE」という。)に溶かし調製した溶液1.2mlを加え、遠心分離(1,300g, 室温, 15分間)により、残渣を取り除いた後、遠心分離(230,000g, 20℃, 12時間)を行なった。遠心後、紫外線照射下でプラスミドDNA層を得た。次にTEで飽和したブタノールによる抽出を行ないエチジウムブロマイドを除いた。この抽出は、3回繰り返して行なった。得られたものは、TEで4℃, 1晩透析を行なった。その後、TE飽和フェノールで1回、クロロホルム・イソアミルアルコールで2回抽出した。次に、1/10容量の3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)溶液と2倍容量のエタノールを加え、-80℃に30分間静置した。その後、遠心分離(12,000g, 4℃, 15分間)により沈澱を回収し、沈澱を70%エタノールで洗浄し、乾燥させ*

[P緩衝液]

TES[N-Tris(hydroxymethyl) methyl]

-2-aminoethane sulphonic acid] 5.73g

サッカロース 103g

塩化マグネシウム 2.03g

硫酸カリウム 0.5g

塩化カルシウム 3.68g

Trace element solution 2ml

/1 (pH 7.4)

なお、1%リン酸-カリウム溶液を別調製し、使用直前に100ml P緩衝液当り1ml加えた。

[0144] [Trace element solution]

塩化亜鉛 40mg

塩化第二鉄 200mg

塩化第二銅 10mg

塩化マンガン 10mg

*た。これをTE 200μlに溶かした。最終的に得られたDNA量は、約10μgであった。

[0140] (2) 宿主の取得

pIJ702含有Streptomyces lividans 3131をYEME培地で30℃, 7日間培養した。

[0141] 次に、培養液をYEME培地で10¹ ~ 10⁸ 倍に希釈し、それぞれの希釈液を100μlずつYEME寒天培地(YEME培地に1.5%寒天を加えたプレート寒天培地)5枚にまいた。そして30℃, 1週間培養した。培養後、ReplicPlate[®] Colony Transfer Pad(宝酒造)を用い、200μg/mlチオストレプトンを含むYEME寒天培地にレプリケーションし、30℃, 1週間培養した。そして分離できたチオストレプトン感受性株1株をStreptomyces lividans 3131-TSとし、宿主として用いた。

[0142] (3) Streptomyces lividans 3131-TS プロトプラストの調製

(2)で得られたStreptomyces lividans 3131-TSをYEME培地+0.5%グリシンで30℃, 2日間培養した。培養液200mlを遠心分離(1,300g, 室温, 10分間)し、得られた菌体を0.35Mサッカロース72mlに懸濁した。次に、この懸濁液を遠心分離(1,300g, 室温, 10分間)し、菌体を1mg/mlのリゾチーム(シグマ)を含むP緩衝液(下記)60mlに再懸濁し、これを30℃, 2.5時間インキュベートした。インキュベート後、この懸濁液を脱脂綿で濾過し残渣を取り除いた。次に、得られた濾液を遠心分離(1,300g, 室温, 10分間)し、P緩衝液25mlで洗浄した。この洗浄を2回繰り返した後、沈澱をP緩衝液1mlに懸濁し、プロトプラスト懸濁液とした。

[0143]

四硼酸ナトリウム 10mg

モリブデン酸アンモニウム 10mg /1

(4) 放線菌における発現型BTG遺伝子断片(Mp-BTG.spm)の構築

BTG遺伝子は、DNAシーケンスの結果、プレプロ体を形成することが予想された。そこで、BTG生産菌であるStreptovorticillium sp. と同じ放線菌であるStre

Streptomyces lividans 3131-TS で発現させることは、他の微生物の場合に比べて前駆体から成熟体へのプロセッシングがスムーズに行なわれるのではないかと考えた。そこで以下の様に発現型 BTG 遺伝子を構築した。

【0145】i) BTG 遺伝子シグナル、プロ領域、構造遺伝子を含む断片の取得
PCR法により、3.6 kbp BTG 遺伝子 NcoI 断片を鋳型*

Primer #3

5'-ACGAGCTCAAAGGAGTTGCAGGTTTCCATGCGCTAT-3'
Sac I (36mer)

Primer #4

5'-CCGGATCCAGATCTCACATCAGGCCAGCCCTGCTT-3'
BamH I Bgl II (36mer)

【0148】なお、PCR法の詳細な条件は、実施例1と同様である。

【0149】ii) me1 (メラニン合成遺伝子) プロモーター領域断片の取得

BTG 遺伝子の発現プロモーター領域として me1 遺伝子を選択した。そこで、PCR法により、pIJ702を鋳型*

Primer #5

5'-ACGAGCTCGTTGGGTTGACGACCCCG-3'
Sac I (26mer)

Primer #6

5'-ACGAATTCTGCCAGTTTTCGCACGTGAGCCA-3'
EcoR I Pst I (30mer)

【0152】なお、PCR法の詳細な条件は、実施例1と同様である。

【0153】iii) BTG 遺伝子断片 (Mp-BTG spm) の構築

PCRで増幅された Mp 断片と pUC19をそれぞれ EcoRI, SacI (TOYOBO) で切断したのち、目的のサイズのことを低融点アガロースを用いて回収した。次に、これらをライゲーションし、大腸菌 DH5 α を、X-gal 及び IPTG 存在下で形質転換した。そして、アンピシリン耐性白色コロニーから得られた Mp 断片が pUC19 の EcoRI-SacI サイトに組み込まれたプラスミドを pUC19-Mp とし、以下の実験に使用した。

【0154】次に、同様に PCR で増幅された BTG spm 断片と pUC19-Mp をそれぞれ BamHI, SacI (TOYOBO) で処理し、サブクローニングを行なった。こうして得られた BT*

*として BTG 遺伝子シグナル、プロ領域、構造遺伝子を含む断片 (以下「BTG spm 断片」と言う。) を取得した。

【0146】PCR に用いた Primer #3 及び Primer #4 の配列を以下に示す。

【0147】

【表18】

※として、me1 遺伝子のプロモーター領域の断片 (以下「Mp 断片」と言う。) を取得した。

【0150】PCR に用いた Primer #5 及び Primer #6 の配列を以下に示す。

【0151】

【表19】

★G spm 断片が pUC19-Mp の BamHI-SacI サイトに組み込まれたプラスミドを pUC19-Mp-BTG spm として、以下の実験に使用した。

【0155】得られたプラスミド pUC19-Mp-BTG spm は PstI, BglII (TOYOBO) で処理し、1.4 kbp Mp-BTG spm 断片を取得した。

【0158】なお、ライゲーションには、ライゲーションキット (宝酒造) を用いた。

【0157】(5) BTG 遺伝子の *Streptomyces lividans* 3131-TS への導入

前項で得られた 1.4 kbp Mp-BTG spm 断片と 5.1 kbp pIJ702 PstI-BglII 断片をライゲーションした。なお、ライゲーションは、以下の反応液を調製し、4℃で1晩インキュベートした。

【0158】

1.4 kbp Mp-BTG spm 断片	8.5 μ l (約 500 ng)
5.1 kbp pIJ702 PstI-BglII 断片	8.5 μ l (約 500 ng)
5 units/ μ l T4 DNA ligase (ペーリンガー)	1.0 μ l
10x ligation buffer (ペーリンガー)	2.0 μ l

インキュベート後、このDNAでStreptomyces lividans 3131-TS を形質転換した。形質転換は下記のように行った。

* [0159] 1. 以下の反応液を調製し、全量140 μ l にした。

* [0160]

DNA溶液 20 μ l
Streptomyces lividans 3131-TS プロトプラスト 100 μ l
0.35M サッカロース 20 μ l

2. 20%ポリエチレングリコール1000を含むP緩衝液を1.5ml加えビベッティングにより穏やかに混和した。

* [0164] 8. ベレットを1mlのP緩衝液に再懸濁した後、200 μ lずつR-2培地に塗布した。

[0161] 3. 室温で2分間静置した。

[0165] [R-2培地] 以下に示したR-2/A及

[0162] 4. 遠心分離 (1,700 g, 室温, 10分間) し、ベレットを集めた。

10. R-2/Bを別調製し、プレート培地作製時にR-2/A, R-2/Bを混合し、さらに1% KH_2PO_4 を最終容量200ml当り1mlの割合で混合した。

[0163] 5. 得られたベレットをP緩衝液で洗浄した。なお、この操作は2回繰り返した。

[0166]

R-2/A

硫酸カリウム 0.5 g
塩化マグネシウム 20.2 g
塩化カルシウム 5.9 g
グルコース 20.0 g
プロリン 6.0 g
カザミノ酸 0.2 g
Trace element solution 4 ml
寒天 44.0 g / 1

R-2/B

TES 11.5 g
イースト・エキス 10.0 g
サッカロース 20.3 g / 1 (pH 7.4)

7. 30°Cで18時間インキュベートした。

[0167] 8. 200 μ g/mlチオストレプトン及び400 μ g/mlチロシンを含むP緩衝液1mlを加え、寒天の全表面を覆った。

30 上記条件下で培養した培養培地100mlを遠心分離 (12,000g, 4°C, 10分間) し、得られた上清を分子量1000の限外濾過膜 (アミコン) を用いて約17倍に濃縮した。

[0168] 9. さらに、30°Cで7日間インキュベートした後チオストレプトン耐性白色コロニーを得た。なお、外来DNA断片が挿入されていないpIJ702を保持するものは、mel遺伝子によりメラニンを合成し、黒色のコロニーとして出現する。こうして得られたいくつかの白色コロニーからプラスミドを調製し、目的とするBTG遺伝子が挿入されているかどうか確認した。

[0172] 次に、調製したサンプルを、精製したBTGを用いてウサギで作製した抗BTG抗体によるEIA法により定量した。その結果約0.1mg/lのBTGを検出できた。

[0169] そして得られたBTG発現分泌ベクターをpIJ702-BTGと名付けた。

[0173] なお、EIAは以下の様に行なった。

[0170] (6) BTG遺伝子の発現

BTG遺伝子を組み込んだ pIJ702-BTG で形質転換した放線菌をStreptomyces lividans AKW-1として以下の培地条件で30°C、5日間培養した。

40 [0174] 1. サンプル50 μ lに緩衝液A 500 μ lを加え混合し、そこに抗体結合ビーズ (ビーズはセキスイのポリスチレン製#80を使用した。) を1個加え、37°C、30分間インキュベートした。

[0171]

ポリペプトン 2%
可溶性デンプン 2%
イースト・エキス 0.2%
リン酸二カリウム 0.2%
硫酸マグネシウム 0.1%

[0175] 2. 反応液を除き、ビーズを10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で2回洗浄した。

[0176] 3. 洗浄したビーズに β -ガラクトシダーゼ標識抗体 (50mu/500 μ l緩衝液A) 500 μ lを加え、37°Cで30分間インキュベートした。

[0177] 4. 反応液を除き、ビーズを10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で2回洗浄した。

50 [0178] 5. 洗浄したビーズをCPRG溶液500

μlに加え、37℃で30分間インキュベートした。*の吸光度を測定した。

【0179】8. 反応停止液2mlを加えた後、575nm* 【0180】

【緩衝液A】

0.1M 塩化ナトリウム
0.1% BSA
1mM 塩化マグネシウム
0.1% アジ化ナトリウム
10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)

【CPRG溶液】

CPRG (クロロフェノールレッドβ-D-
ガラクトピラノシド、ペーリンガー) 1g
BSA 333.2 mg
リン酸-カリウム 833.2 mg
亜硫酸ナトリウム 166.8 mg
GH 333.2 ml /l (pH 5.0)

【GH】

5% 加水分解ゼラチン
0.3M 塩化ナトリウム
1mM 塩化マグネシウム
0.1% アジ化ナトリウム
0.1% BSA
50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)

【反応停止液】

10mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム
1% ガラクトース
0.1% アジ化ナトリウム
50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)

さらにこの組み換えBTGをウエスタンブロットにより解析した。まず、サンプルを既往の方法により処理し、SDS-PAGE電気泳動を行なった。SDS-PAGE 30
E電気泳動後、ゲル上のタンパク質をElectrophoretic Transfer Kit(LKB)を用いてメンブレン(Immobilon™ (ミリポア))にトランスファーした。トランスファーの条件は、Electrophoretic Transfer Kitに添付されている説明書に従った。トランスファー後、メンブレンをBlocking Buffer(20mM Tris-HCl(pH7.9), 5%スキムミルク)10ml中にて1時間インキュベートした。その後、メンブレンを、BTG抗血清を200倍にRinse Buffer(10mM Tris-HCl(pH 7.9), 0.15M NaCl, 0.1mM EDTA(3Na), 0.25%スキムミルク, 0.01% NaN₃)で希釈した溶液10ml中にて1晩、4℃でインキュベートした。インキュベート後、溶液を捨て、メンブレンを20mlのRinse Bufferで2度洗浄した後、次にメンブレンをAnti rabbit ¹²⁵Iラベルwhole antibody (アマシャム) 1μCiを含むRinse Buffer 10ml中に移し4℃で4時間インキュベートした。インキュベート後、メンブレンを20mlのRinse Bufferで2回洗浄し、その後メンブレンを取り出し、風乾した。風乾後、メンブレンをオートラジオグラフィーにかけ、シグナルを検出した。

【0181】結果は、精製BTGと同一分子量である約 50

37kDaの位置に成熟体タンパク質としてのBTGが認められた(第2図参照)。この事は、Streptomyces lividans AKW-1によるBTG遺伝子発現において、前駆体遺伝子を導入したにもかかわらず成熟体タンパク質を分泌したことを示し、正しくプロセッシングがなされたことを示唆する。

【0182】実施例5: BTG遺伝子(合成型)の酵母での発現

酵母におけるBTGの発現には、シグナル配列遺伝子の下流にBTG成熟体遺伝子或いはBTGプロ配列遺伝子とBTG成熟体遺伝子を組み込んだ発現ベクターを用いるという二つの方法をとった。

【0183】発現ベクターとしては、酵母において強力なプロモーター活性を有するとして知られている解糖系のエノラーゼ遺伝子(ENO1)のプロモーター配列を含む大腸菌・酵母シャトルベクターpNJ 1053を用いた。ENO1のプロモーターを利用した酵母での発現は、ヒトリゾチウム(Ichikawa, K.等, Agric. Biol. Chem., 53, 2687(1989)など)が知られているが本ベクターはpBR32由来の大腸菌における複製オリジン、アンピシリン耐性遺伝子及び酵母の2μm複製オリジン、選択マーカーとしてはLEU2遺伝子とを併せ持つ高コピー型(YEp)ベクターである。

*す.

10

HindIII

20※ またシグナル配列遺伝子や成熟体遺伝子との連結のための制限酵素認識部位を配置した。即ち、プロ配列遺伝子の5'末端にはシグナル配列遺伝子との連結のためのHindIII 粘着末端配列を、3'末端には実施例2で化学合成されたBTG遺伝子のPvuII 認識部位に連結するための配列を配置した。

[0 1 8 9]

【表 2 1】

Kind III

70

130

140

50

チドは、実施例2で化学合成されたB T G遺伝子の合成の時と同様の手順によりリン酸化、アニーリング、ライゲーションという反応を行なった。反応後、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、約150bpのD

NA断片をゲルから回収した。次に、(1)と同様に p HSG396-GS のHindIII 消化物と、回収した約150bpの合成オリゴヌクレオチド及び実施例2で化学合成されたBTG遺伝子のPvuII・HindIII断片(約1kb)とを連結し、BTGプロ配列遺伝子がシグナル配列とBTG成熟体遺伝子の間に正しく挿入されたものを選択した。さらにこれをXhoI認識部位上流に存在するSalIとHindIIIで切断し、約1.2 kbpの断片を得、酵母発現ベクター p NJ1053のENO1プロモーターの下流に存在するSalI、HindIII間に挿入した。これを大腸菌JM109株に導入し、発現分泌ベクター pNJ1053-proBTGを得た。

【0191】(3)酵母におけるBTG遺伝子の発現
(1)、(2)で各々得られた発現分泌ベクターpNJ1053-BTGとpNJ1053-proBTGの宿主酵母*Saccharomyces cerevisiae* KSC22-1C (MATa, *ssl1*, *leu2*, *his*⁻, *ura3*)への導入は、アルカリ金属処理法(Ito, H.等, *J. Bacteriol.*, 153, 163-168 (1983))を用いた。その*

合成培地	0.67%	YNB
	8%	グルコース
	20mg/l	L-ヒスチジン塩酸塩
	20mg/l	ウラシル
	0.5%	Casamino acid (Difco社)

次いでガラスビーズ法(Hitzeman, R.A.等 *Science*, 219, 620-625 (1983)など)により菌体抽出液を調製した。すなわち培養液10mlから遠心分離により集菌し、滅菌水で1回洗浄後、1mlのTris-HCl (pH 6.0)に懸濁する。これに1mlのガラスビーズ(ビーブラウン社、径0.45-0.5mm)を加え、Vortexミキサーを用い0~4℃で1分間激しく攪拌を3回行う。低速遠心でガラスビーズを分離後、上清をエッペンドルフチューブに移し、さらに12,000 rpmで5分間遠心し、その上清を取り抽出液とした。

【0194】そこで、BTG遺伝子産物が生成していることを確認するため、精製BTGを用いてウサギで作製した抗BTG抗体によるウェスタン・ブロッティングを、ベクター社のVectastain ABC kitを用いて行なった。発現分泌ベクターpNJ1053-BTGあるいはpNJ1053-proBTGを保持する各々の酵母の菌体抽出液の総タンパク量にして約1μgになる量をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、泳動後のゲルをメンブレン(Immobilon, ミリポア社)にトランスファーして抗原となるタンパク質をメンブレンに結合させた。その後、ウサギ抗BTG抗体(抗体価64倍のものを1000倍希釈した)によるウェスタン・ブロッティングを行ない、遺伝*

配列

GATTCTGATG ACAGAGTCAC TCCACCAGCT GAACCATTCG ATAGAATGCC AGATCCATAC	60
AGACCATCTT ACGGTAGAGC TGAACACTGT GTCAACAACT ACATTAGAAA GTGGCAACAA	120
GTCTACTCTC ACAGAGATCG TAGAAAGCAA CAAATGACTG AAGAACAAG AGAATGGTTG	180
TCTTACGGTT GTGTTGGTGT TACTTCGGTT AACTCTGCTC AATACCCAAC TAACAGATTG	240
CTTTTCGCTT CTTTCGATGA AGATAGATTC AAGAACGAAT TGAAGAACGG TAGACCAAGA	300

*際、栄養要求性交異を相補する遺伝子を組み込んだプラスミドで形質転換されたクローンの選択、培養には最少培地が必要であるが、形質転換体の選択に用いた最少培地は、Difco社より市販されているbacto yeast nitrogen base (YNB)の0.67%溶液に2%グルコース、そして宿主酵母の栄養要求性に応じて20mg/l L-ヒスチジン塩酸塩、20mg/l ウラシルを添加したものである(プレートの場合はさらに2%アガーを加える)。Leu⁺となった形質転換体は、30℃で培養すると2~4日でコロニーを形成した。

【0192】これら分泌発現ベクターpNJ1053-BTGあるいはpNJ1053-proBTGを保持する形質転換体をそれぞれ、プラスミドの脱落を防ぐため最少培地で30℃、一晩前培養した後、下に示す組成の合成培地10mlに植えつけ(5%)30℃、2日間振盪培養した。

【0193】

※子産物をタンパクレベルで確認した。

【0195】その結果、以下の1、3、4のレーンにおいて同一の位置に発色したバンドが現われ、抗BTG抗体との反応を示すタンパク質が精製BTGと同一分子量の位置に検出された。

【0196】1.: 精製BTG (コントロール)

2.: pNJ1053を保持する酵母の菌体抽出液

3.: pNJ1053-BTG (BTG成熟体遺伝子)を保持する酵母の菌体抽出液

4.: pNJ1053-proBTG (BTGプロ配列-成熟体遺伝子)を保持する酵母の菌体抽出液

なお、各々について培養上清もウェスタン・ブロッティングを行なったが、培養上清にはバンドが検出されなかった。また、レーン4のBTGプロ配列-成熟体遺伝子を組み込んだ分泌発現ベクターpNJ1053-proBTGを保持する酵母では、酵母内で合成したプロ配列のプロセッシングが、正しく行われたため、精製BTGと同一分子量の位置にバンドが現われたものと考えられる。

【0197】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 993

配列の型: 核酸

37

38

TCCGGTGAAA CTAGAGCTGA ATTGGAAGGT AGAGTTGCTA AGGAATCTTT CGATGAAGAA 360
 AAGGGTTTCC AAAGAGCTAG AGAAGTTGCT TCTGTTATGA ACAGAGCTCT AGAAAACGCT 420
 CACGATGAAT CTGCTTACTT GGATAACTTG AAGAAGGAAT TGGCCAACGG TAACGATGCT 480
 TTGAGAAACG AAGATGCTAG ATCCCATTC TACTCTGCTT TGAGAAACAC TCCATCTTTC 540
 AAGGAAAGAA ACGGTGGTAA CCAGGATCCA TCCAGAATGA AGGCTGTTAT TTAATCTAAG 600
 CACTTCTGCT CTGGTCAAGA TAGATCTTCT TCTGCTGATA AGAGAAAGTA CCGTGATCCA 660
 GATGCTTTCA GACCAGCTCC AGGTACCGGT TTGGTCGACA TGTCCAGAGA TAGAAACATT 720
 CCAAGATCCC CAATCTCTCC AGGTGAAGGT TTGCTCAACT TGGATTACGG TTGGTTCGGT 780
 CCTCAAACTG AAGCTGATGC TGATAAGACT GTTTGGACCC ATGGTAACCA CTACCACGCT 840
 CCAAACGGTT CTTTGGGTGC TATGACGTC TACGAATCTA AGTTCAGAAA CTGGTCTGAA 900
 CGTACTCTG ATTTCGATAG AGGTGCTTAC GTTATTACTT TCATTCAAA GTCTTGAAC 960
 ACTGCTCCAG ACAACGTCAA GCAAGTTGG CCA 9
 9 3

配列番号: 2

配列の長さ: 117

* 配列の型: 核酸

*

配列

AAGAGAAGAT CTCCAACTCC AAAGCCAAT GCTTCTAGAA GAATGACTTC TAGACACCAA 60
 AGAGCTCAA GATCTGCTCC AGTGTCTTCT TCTGCTGGTC CATCTTTCAG AGCTCCA 117

配列番号: 3

配列の長さ: 1322

* 配列の型: 核酸

※20

配列

TCCGGGACG CGTAGCAAT GGGGTTTCT CCGGACGTGC TTCGGCACGG CCGGTTCAA 60
 CGATGTTCCA CGACAAAGGA GTTCAGGTT TCCATGCGCT ATACGGCGGA GGCTCTGCTC 120
 TTGCGCACTA TGAGTGCGGT TTATGCACGG CCGGATTCAT GCGTCCGCC GCGGAGGCCG 180
 CCGCGACAA TGGCCCGGG GAAGAGACGA AGTCTACGC CGAAACCTAC CCGCTCACGG 240
 CCGATGACGT CCGGACATCA ACGGCTCAA CGAAGCGCTC CCGCGGCTTC GAGCGCCGGC 300
 CCGTCTTCC GGGCCCCGA CTCGACGAC ACGGTCAACC CTCGCCCGA CCGCTCGAC 360
 AGGATCCCC ACCCGTACG TCCCTGTAC GCGAGGCCG AGACGGTCT CAACAACCTAC 420
 ATACGCAAGT GCGACGAGT CTACGCGAC CCGGACGCA GGAAGCAGCA GATGACCGAG 480
 GAGCAACGG AGTGCTGTC CTACGCTGC GTGGGTGTC CCTGGTCAA TTCGGTCAG 540
 TACCCACGA ACAGACTGC CTTCGGTCC TTGACGAGG ACAGGTTCAA GAACGAGCTG 600
 AAGAACGCA GCGCCCGTC CCGGAGAGG CCGCGGAGT TCGAGGCCG GTTCGGGAG 660
 GAGAGCTTTG ATGAAGAGAA GGGGTTCCAG CCGCGCGTG AGTGCGGTC CGTGATGAAC 720
 AGGGCCCTGG AGAAGGCCA CGACGAGAC GCTTACCTCG ACAACCTCAA GAAGGAACCTG 780
 CCGAAGGCA ACGACGCCCT CCGCAACGAG GAGCGCGTT CCGGTTCTA CTGGCGCTG 840
 CCGTCACTCT ACTCGAAGCA CTCTGAGC GCGGAGACC GGTGAGTTC GCGGACAAG 900
 AGGAAGTACG GCGACCGGA CGCTTTCGC CCGCGCCCG GAGCGGCTT GTTCGACATG 960
 TCGAGGACA GGAACATTCC CCGGAGGCC ACCAGCCCG GTGAGGATT CGTCAATTTC 1020
 GACTACGGCT GGTTCGGCC CAGACCGAA CCGACCCCG ACAAGACCT CTGACCCAC 1140

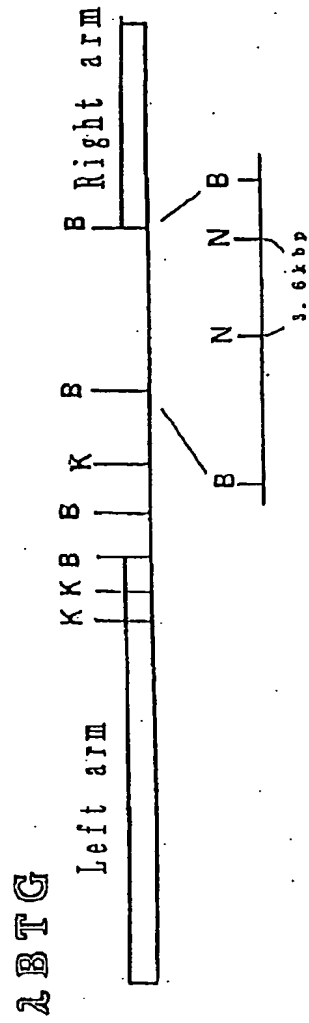
CGAAATCACT ATCAGCGGCC CAATGGCAG CTTCGTGCA TCGATGTATA CGAGACCAAG 1200
 TTCCGCAACT GGTCCGAAG TTAATCCGAC TTGACCCCG GAGCCTATGT GATCACCTTC 1260
 ATCCCAAGA GCTGGAACAC CCGCCCGAC AAGGTAAAG AGGCTGCGC GTGATGTGAG 1320
 CG 1322

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図。Streptoverticillium sp. 由来のクローンDNAの制限地図。

【図2】第2図。Streptomyces lividans で発現したB TGのウェスタンブロット解析結果。

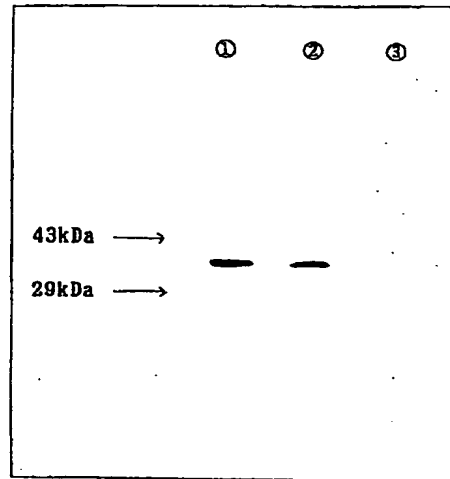
【図1】



K:KpnI, B:SamHI, N:NcoI

第1図

【図2】



- ① 精製BTG
 ② pIJ702-BTG
 ③ pIJ702

第 2 図

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 15/70
 // C 0 7 K 13/00
 (C 1 2 N 15/54
 C 1 2 R 1:625)
 (C 1 2 N 1/19
 C 1 2 R 1:865)
 (C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:465)
 (C 1 2 N 9/10
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 15/70
 C 1 2 R 1:19)

8619-4H

(72)発明者 松井 裕
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内
(72)発明者 鷺津 欣也
茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製菓株式会社筑波研究所内

(72)発明者 安藤 啓一
茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製菓株式会社筑波研究所内
(72)発明者 小池田 聡
茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製菓株式会社筑波研究所内